

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/RU04/000541

International filing date: 30 December 2004 (30.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: RU
Number: 2004100856
Filing date: 15 January 2004 (15.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 03 May 2005 (03.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ



ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995
Телефон 240 60 15. Телекс 114818 ПДЧ. Факс 243 33 37

Наш № 20/12-205

“29” марта 2005 г.

СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности (далее – Институт) настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы, реферата и чертежей (если имеются) заявки № 2004100856 на выдачу патента на изобретение, поданной в Институт в январе месяце 15 дня 2004 года (15.01.2004).

Название изобретения:

Противоопухолевые и противовирусные пептиды

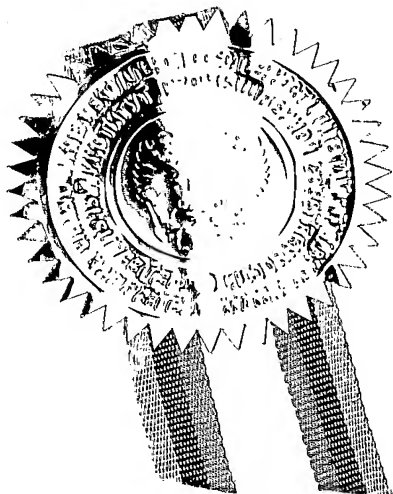
Заявитель:

ЧЕРНЫШ Сергей Иванович

Действительные авторы:

ЧЕРНЫШ Сергей Иванович

БЕККЕР Герман Петрович



Заведующий отделом 20

А.Л.Журавлев

Черныш Сергей Иванович

Беккер Герман Петрович

Противоопухолевые и противовирусные пептиды

Область техники.

Предлагаемое изобретение относится к пептидам и белкам противоопухолевого и противовирусного действия, а также к лекарственным средствам на их основе.

Уровень техники

Известны противоопухолевые пептиды из группы блеомицина (Н.И. Переводчикова Клиническая химиотерапия опухолевых заболеваний, М., Медицина, 1976, с. 100-103). Блеомицины оказывают прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки, однако возможности их применения в клинике ограничены выраженными побочными эффектами, прежде всего со стороны легких и почек.

Известно применение рекомбинантных белков из группы интерферонов в качестве активаторов противоопухолевого иммунитета и ингибиторов пролиферации опухолевых клеток. Интерфероны применяются для лечения множественной миеломы (Zee et al., J. Clin. Oncol., 1998, 16, 8, p. 2834-2839), болезни Ходжкина (Aviles et al. Leuk. Lymphoma, 1998, 30,5-6, p. 651-656), миелоидной лейкемии (Gilbert, Cancer, 1998, 83,6,p.1205-13). Однако высокая стоимость интерферонов делает их малодоступными для широкого клинического применения. Другим ограничением служат побочные эффекты, связанные с возможной пирогенностью, иммуногенностью и другими нежелательными свойствами рекомбинантного интерферона.

Известны предложения по использованию пептидных индукторов апоптоза в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов (Rutledge, Chin and Schepartz Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6, p. 479-485). Однако клинические перспективы этого направления остаются неизученными. В настоящее время на стадии разработки и клинических испытаний в качестве противоопухолевых средств находится ряд белковых препаратов цитокиновой природы (SK Narula, R Coffman, eds. New cytokines as potential drugs, Birkhauser Verlag, Basel, 2000, 141 pp.). Наибольшую известность получило использование интерлейкина-2, однако высокая токсичность и стоимость

рекомбинантного интерлейкина-2 ограничивают его применение в широкой онкологической практике.

Известно применение белков гемоцианинов и арилфоринов в качестве активаторов иммунного ответа и противоопухолевых агентов (патент США № 5231081).

Несмотря на наличие перечисленных выше и других разработок, описанных в литературе, терапия онкологических заболеваний во многих случаях остается малоэффективной и практически всегда высокотоксичной и дорогостоящей. Поэтому поиски новых подходов к терапии опухолей остаются одной из наиболее острых проблем современной медицины.

Известны иммуномодулирующие пептиды - аллофероны (патент России № 2172322). Основной областью применения аллоферонов является лечение вирусных инфекций. В то же время имеются сведения о противоопухолевых свойствах аллоферонов, основанных на активации механизмов противоопухолевого иммунитета - интерферонов и естественных киллеров (Chernysh et al., Proceedings of National Academy of Science, 2002, 99, p. 12628-12632). Аллофероны являются наиболее близкими аналогами предлагаемого изобретения по химической структуре и механизму действия.

Сущность изобретения.

Экспериментальные исследования противоопухолевой активности аллоферона показали, что этот пептид подавляет рост сингенного опухолевого трансплантата у мышей и на этом основании может быть отнесен к перспективным противоопухолевым препаратам. Эффект аллоферона реализуется на уровне системного ответа организма на трансплантированную опухоль. В то же время на клеточном уровне влияние аллоферона на пролиферацию опухоли оказывается более сложным. В частности, эксперименты *in vitro* показали, что аллоферон, в зависимости от концентрации в культуральной среде, может как ингибировать (в области высоких концентраций), так и стимулировать (в области низких концентраций) пролиферацию опухолевых клеток. Наличие ростстимулирующей активности ограничивает возможности использования аллоферона для терапии опухолей, где подавление пролиферации малигнизированных клеток является основной целью лечения.

Задачей настоящего изобретения является разработка препаратов, которые, сохраняя иммуномодулирующий механизм действия аллоферона, в то же время обладали бы сниженной ростстимулирующей активностью и повышенной антипролиферативной и цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток.

С этой целью разработано новое семейство пептидов, отличающихся от аллоферонов и других биологически активных соединений структурой, механизмом действия и достигаемым терапевтическим эффектом.

Предлагаемая группа соединений относится к линейным пептидам, строение которых описывается следующей структурной формулой:



где X_1 отсутствует, либо содержит не менее 1 аминокислоты,

X_2 отсутствует, либо содержит не менее 1 аминокислоты.

При разработке настоящего изобретения в качестве базовой структуры был использован пептид, представленный в Таблице 1 под названием аллостатин 1 (SEQ ID NO 1). Аллостатин 1 был синтезирован методом твердофазного синтеза и использован для изучения биологической и терапевтической активности предлагаемых пептидов. Исследования, результаты которых суммированы в приведенных ниже примерах, показали, что данный пептид обладает противоопухолевой активностью, основанной на прямом подавлении пролиферации опухолевых клеток и усилении определенных звеньев противоопухолевого иммунитета.

Компьютерный анализ баз данных по структуре и свойствам белков и пептидов установил, что данное соединение относится к новому неизвестному ранее семейству биологически активных пептидов. Оригинальная структура предлагаемых пептидов обеспечивает достижение нового технического уровня - возможности эффективного подавления опухолевого роста и лечения на этой основе онкологических заболеваний. Анализ гомологии аминокислотных сиквентов аллостатина 1 и известных белков и пептидов, выполненный при помощи программы Blast search по материалам базы данных Swissprot, выявил ряд структурных аналогов предлагаемых пептидов. Эти данные суммированы в Таблице 1.

Выявленные сиквенсы с высоким уровнем гомологии по отношению к аллостатину 1 принадлежат к однородной с точки зрения структуры, функций и происхождения группе соединений – прионовым белкам (PrP). Прионовые белки (прионы) продуцируются клетками различной тканевой принадлежности многих видов животных, в том числе человека и других млекопитающих. Функции прионов в норме остаются малоизученными. В то же время известно, что при определенных условиях прионы могут претерпевать конформационные изменения, в результате которых возникает патологическая изоформа scrapie, ответственная за развитие некоторых нейродегенеративных заболеваний. Зрелый прионовый белок обычно содержит более

200 аминокислотных остатков. Патологические свойства прионов связаны с фрагментами, гомологичными фрагменту 114-134 PrP I быка, в особенности амилоидному гидрофобному участку AGAAAAGA этого фрагмента (Kougie, J.I. *Chem. Biol. Interact.*, 2001, 138, 1-26; Taylor, S.C., Green, K.N., Smith, I.F. & Peers, C. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2001, 281, 1850-1857). Аллостатин 1 гомологичен повторяющимся участкам 64-75, 72-83, 80-91, 87-98, 96-108 и структурно совершенно отличен от участка 114-134 PrP I. Тесное структурное сходство этих участков и предлагаемых пептидов (например, в участке 96-108 PrP I быка совпадают с аллостатином 11 аминокислот из 13 или 84%) предполагает и сходство биологической активности. Поэтому с высокой степенью вероятности можно предположить, что фрагменты прионов млекопитающих, гомологичные предлагаемым противоопухолевым пептидам, также обладают сходной противоопухолевой активностью. Механизм вероятного противоопухолевого действия этих фрагментов неизвестен, однако есть данные, согласно которым прионы имеют отношение к регуляции активности Т-лимфоцитов (Mabbott, N.A., Brown, K.L., Manson, J. & Bruce, M.E. *Immunology*, 1997, 92, p.161-165). Т-лимфоциты, в свою очередь, играют ключевую роль в реакциях противоопухолевого иммунитета.

Структурно-функциональное сходство с фрагментами прионов млекопитающих позволяет выделить потенциально вариабельные участки сиквенса предлагаемых пептидов, в которых замена состава и порядка следования аминокислот не окажет существенного влияния на функциональные свойства молекулы в целом. С учетом распределения вариабельных и консервативных участков аминокислотных последовательностей, приведенных в Таблице 1, общая структурная формула (1) включает две вариабельные зоны X_1 и X_2 , разделенные консервативной последовательностью из аминокислот триптофана, глицина и глутамина (Trp-Gly-Gln). Вариабельный участок X_1 может отсутствовать или содержать до 5 и более аминокислот. Вариабельный участок X_2 может отсутствовать или содержать до 7 и более аминокислот. При этом предлагаемые пептиды могут входить в состав более крупных аминокислотных последовательностей в качестве функционально важной части других полипептидов и белков, например прионовых белков с длиной цепи до 250-300 аминокислот.

Соединения предлагаемой структуры, представленные аллостатином 1, синтезированы с использованием твердофазного метода синтеза и охарактеризованы методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс спектрометрии. Они могут быть получены в виде эфиров, солей, амидов или иных фармацевтически приемлемых

производных. Помимо химического синтеза, предлагаемые пептиды можно получать методами генной инженерии или извлекать их из природных источников.

Другими структурными аналогами предлагаемых пептидов являются аллофероны, общая структурная формула которых дана в патенте России № 2172322. Результаты сравнительного анализа структурных формул аллоферонов и предлагаемых пептидов, аллостатинов, приведены в Таблицах 2 и 3. В Таблице 2 сопоставлена структура аллоферона 1 (SEQ ID NO 12) и аллостатина 1 (SEQ ID NO 1), двух характерных представителей сравниваемых семейств пептидов. Из сравнения видно, что эти пептиды различаются аминокислотами в позициях 6 и 11, представленных у аллоферона 1 гистидином и валином, а у аллостатина 1 триптофаном и треонином, соответственно. Позиции 6 и 11 составляют неизменную часть и характерный признак всех аллоферонов согласно патенту России № 2172322. Замена аминокислот в этих позициях на триптофан и треонин приводит к желаемому изменению биологической активности и терапевтического эффекта, как показано в приведенных ниже примерах. Сопоставление общих структурных формул (Таблица 3) показывает, что состав консервативных участков и расположение вариабельных участков в составе молекулы аллостатинов и аллоферонов качественно различаются. На этом основании они могут быть отнесены к двум разным семействам пептидов.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Пример 1. Синтез аллостатина 1

Пептид, состоящий из 13 аминокислот, соответствующих структуре аллостатина 1, был синтезирован методом твердофазного синтеза на автоматическом многоканальном синтезаторе Multisyntech GmbH Witten с использованием Fmoc-(N-[9-флуоренил] метоксикарбонил)-замещенных аминокислот. Очистка синтезированного пептида производилась методом обратнофазной ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC8 с колонкой Chromasil C18, 10 мм. Чистоту полученного пептида контролировали также методом ВЭЖХ (Рис. 1). Корректность синтеза подтверждена масспектрометрически методом MALDI-TOF на приборе Finnigan TSQ 7000 (рис 2). Экспериментально установленная масса пептида соответствует расчетной, различия находятся в пределах ошибки измерения.

Пример 2. Влияние аллостатина на пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*

Целью экспериментов, изложенных в настоящем разделе, является сравнительный анализ влияния аллостатина и аллоферона на пролиферацию опухолевых клеток. Сравнивали эффект аллостатина 1 и аллоферона 1 в концентрациях 0.001, 0.01, 0.1, 1 и 10 мкг/мл на пролиферативную активность в массовой культуре опухолевых клеток линии Р388Д1. В лунки 24-луночных планшетов высевали по 5000 клеток, суспендированных в 2 мл среды RPMI 164. В опытах использовали среду, содержащую 5% фетальной сыворотки телят производства фирмы «Биолот». Препараты вносили в лунки в 0.2 мл той же среды сразу после посева клеток, в контроле вносили эквивалентное количество среды без препаратов. Количество клеток в 1 мл инкубационной среды определяли с помощью камеры Горяева. На основе 3-х независимых определений рассчитывали среднее количество клеток в 1 мл инкубационной среды через 21, 44, 90 и 114 часов после начала опыта.

На рисунке 3 представлена характерная картина влияния аллостатина и аллоферона на динамику роста популяции опухолевых клеток. В качестве критерия оценки антипролиферативной активности препаратов здесь выбрана величина кратности роста популяции за 90 часов наблюдения, определяемая как соотношении количества клеток на лунку в начале и конце периода инкубации. За этот период в контроле количество клеток возросло примерно в 30 раз. В присутствии препаратов количество клеток и, соответственно, скорость пролиферации снижались дозозависимым образом. При этом аллостатин в диапазоне концентраций 0.001-1 мкг/мл в 3-7 раз превосходил аллоферон по антипролиферативной активности. Аллостатин в концентрации 10 мкг/мл практически полностью прекратил рост популяции опухолевых клеток в наблюдаемый период.

Таким образом, данный пример демонстрирует наличие у аллостатина антипролиферативной активности и его преимущество в этом отношении по сравнению с аллофероном.

Пример 3. Взаимодействие аллостатина и противоопухолевых цитостатиков *in vitro*

В этом примере приведены материалы, демонстрирующие взаимодействие аллостатина и классического цитостатика, циклофосфида, в отношении подавления клоногенной активности опухолевых клеток. Показатель клоногенной активности позволяет определить, какая доля опухолевых клеток из общего пула способна давать жизнеспособные клоны и таким образом участвовать в росте и распространении опухоли. Основная цель химиотерапии состоит в уничтожении именно этих активно пролиферирующих клеток.

Методика постановки эксперимента состояла в следующем. Клетки лимфоидной неоплазмы мыши линии P388Д1 культивировали в среде RPMI 1640, содержащей глутамин, гентамицин и 10% эмбриональной сыворотки телят «High clone». При постановке опыта в ячейки 24-луночных культуральных планшетов вносили по 100 клеток P388Д1 в 1 мл среды указанного состава. Сразу после этого в лунки вносили по 0,1 мл среды без проверяемых препаратов (контрольные лунки) или с препаратами. Каждый вариант опыта был поставлен в трех независимых повторностях. Количество клонов подсчитывали через 7 дней после начала культивирования.

Как видно из Таблицы 4, в условиях данного эксперимента около 15% опухолевых клеток образовали жизнеспособные клоны. Ни циклофосфамид, ни аллостатин, взятые в отдельности, не оказали заметного влияния на процесс клонирования. В то же время их сочетание существенно снизило клоногенную активность опухолевых клеток, пропорционально дозе аллостатина.

Настоящий пример показывает, что аллостатин имеет перспективы использования в комбинированной химиотерапии опухолей в сочетании с цитостатиками типа циклофосфамида.

Пример 4. Противоопухолевое действие аллостатина на модели перевивных опухолей у мышей

Лабораторным мышам линии DBA-1 подкожно прививали по 3000 опухолевых клеток сингенной линии P388Д1. На следующий день животные были разделены на 4 экспериментальные группы. В первой группе они получали только аллостатин подкожно в дозе 25 мкг на 4, 11 и 18 сутки после трансплантации опухолевых клеток; во второй группе комбинацию цитостатиков циклофосфамида (0.56 мг), доксорубина (0.036 мг) и винкристина (1.05 мкг) в день трансплантации, через 7, 14 и 21 сутки; в третьей группе аллостатин и комбинацию цитостатиков по той же схеме. В четвертой группе (контроль) животным в те же сроки вводили растворитель (0.9% NaCl).

В контрольной группе пальпируемые опухоли в месте трансплантации клеток начали появляться через 20 дней, через 25 дней все мыши имели типичные подкожно расположенные опухоли размером от 5 до 26 мм в диаметре (Рис. 4). В группах, получавших отдельно аллостатин или цитостатики, опухоли появлялись с задержкой, у небольшой части животных опухоли не сформировались на протяжении всего срока наблюдения. В то же время сочетание аллостатина и цитостатиков обеспечило резкое и во многих случаях необратимое противоопухолевое действие. В этой группе только у 40%

мышей сформировались опухоли в течение периода наблюдения ($P < 0.001$ по отношению к контролю и $P < 0.05$ по отношению к группе, получавшей только цитостатики).

Данный пример, как и пример 3, свидетельствует, что аллостатин оказывает выраженное противоопухолевое действие при применении в сочетании со средствами стандартной химиотерапии, широко используемыми при лечении лейкозов и других онкологических заболеваний.

Пример 5. Иммуномодулирующая (интерфероногенная) активность аллостатина

Аллофероны относятся к иммуномодуляторам, механизм действия которых связан с индукцией синтеза интерферонов лейкоцитами крови (Chernysh et al., Proceedings of National Academy of Science, 2002, 99, p. 12628-12632). Одна из целей настоящего изобретения состояла в сохранении иммуномодулирующего действия в спектре биологической активности аллостатинов. Настоящий пример иллюстрирует иммуномодулирующую активность аллостатина 1 на модели индукции синтеза интерферона лейкоцитами человека *in vitro*.

Образцы донорской крови смешивали с водным раствором испытуемого препарата и культуральной средой в отношении 1:1:8. Конечная концентрация препаратов в инкубационной смеси составляла 0 (контроль), 0.01, 0.1, 1 или 10 мкг/мл в различных вариантах опыта. Эту смесь инкубировали в течение 24 часов при 37°C в CO₂ термостате. Затем клетки крови были осаждены центрифугированием. После этого сериальные разведения полученного супернатанта были помещены в лунки 96-луночного планшета, содержащие монослой тест-культуры клеток L-41, и проинкубированы 24 ч в тех же условиях. Затем монослой клеток был инфицирован вирусом везикулярного стоматита в дозе, равной 100 ЦПД₅₀ (доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя) и проинкубирован 18 ч при 37°C. Затем клетки были окрашены 0.1% раствором красителя кристалльный фиолетовый. Доля разрушенного вирусом монослоя была определена путем измерения оптической плотности экстрагированного красителя при длине волны 590 нм. Полученные значения сравнивались с эффектом референс-препарата интерферона-альфа и полученный титр интерферона рассчитывался в единицах (МЕ) антивирусной активности интерферона-альфа. На рисунке 5 суммированы результаты исследования образцов крови 6 доноров, взятые в двух аналитических повторностях (всего 12 определений для каждой точки).

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что интерфероногенная активность аллостатина и аллоферона существенно не различается. Следовательно, аллостатин, приобретая специфические свойства, полезные для его применения в качестве

противоопухолевого препарата, в то же время сохраняет присущую аллоферону иммуномодулирующую активность. На этом основании аллостатин может быть использован в онкологии и других областях, где это может быть полезно) в качестве препарата двойного действия: прямого (цитотоксический и антипролиферативный эффект, потенцирование эффекта цитостатиков) и опосредованного (иммуномодулирующего).

Пример 6. Антивирусная активность аллостатина

В исследованиях противовирусного действия аллостатина в качестве модели использовали летальную гриппозную инфекцию у беспородных белых мышей обоего пола массой 14-16 г. В работе использовали вирус гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), адаптированный к белым мышам. Аллостатин и аллоферон растворяли в дистиллированной воде и вводили животным по 0,25 мл подкожно из расчета 25 мкг на мышь (1,5 мг/кг веса). В качестве плацебо в контрольной группе вводили дистиллированную воду. Для определения противовирусной активности препаратов использовали профилактическую схему введения – однократное введение препаратов за 24 часа до заражения. Вирус вводили животным интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 3 и 30 LD₅₀. В каждую группу наблюдения брали по 10 мышей. Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней. Фиксировали смертность животных в контрольных и опытных группах. Результаты эксперимента представлены в Таблице 5. Оба препарата обеспечивали одинаково эффективную защиту от летальной гриппозной инфекции у мышей.

Таким образом, аллостатин сохраняет антивирусную активность, характерную для аллоферона. На этом основании можно предполагать, что аллостатин может быть использован в качестве антивирусного средства, как и аллоферон. При этом наиболее целесообразно его применение вместо аллоферона в случае пограничных состояний, объединяющих вирусную и онкологическую патологию, например при опухолях вирусной этиологии или для лечения вирусных заболеваний у онкологических больных.

Формула изобретения

1. Пептиды, характеризующиеся общей структурной формулой



или их фармацевтически приемлемые соли, или эфиры, или амиды,

где X_1 отсутствует, либо содержит не менее 1 аминокислоты,

X_2 отсутствует, либо содержит не менее 1 аминокислоты.

2. Пептид по п. 1, содержащий до 30 аминокислотных остатков, предпочтительно 5-15 аминокислотных остатков
3. Пептид по пп. 1 и 2, где X_1 выбран из группы, содержащей 0 аминокислот, His-Gly-Val-Ser-Gly-, His-Gly-Gly-Gly-, His-Val-Gly-Gly-, His-Gly-Gly-Gly-Gly-, Gln-Gly-Gly-Gly-Gly- и His-Gly-Gly-Gly-
4. Пептид по пп. 1 и 2, где X_2 выбран из группы, содержащей 0 аминокислот, -His-Gly-Thr-His -Gly, -Gly-Gly-Thr-His-Gly, -Pro-His-Val-Gly-Gly, -Pro-His-Gly-Gly-Gly, -Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly, -Gly-Gly-Gly-Thr-His-Ser
5. Пептид по п. 1, выбранный из группы, содержащей His-Gly-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-His-Gly-Thr-His -Gly, His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly, His-Gly-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Gly-Gly-Thr-His-Gly, His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Val-Gly-Gly, His-Val-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly, Gln-Gly-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly, His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly -Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly, His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Gly-Gly-Gly-Thr-His-Ser
6. Белки и полипептиды, в состав которых входят аминокислотные последовательности по пп. 1-5
7. Пептиды по пп. 1-5, обладающие антипролиферативной и цитотоксической активностью
8. Пептиды по пп. 1-5 и белки и полипептиды по п. 6, обладающие противоопухолевой активностью
9. Пептиды по пп. 1-5 и белки и полипептиды по п. 6, обладающие антивирусной активностью
10. Пептиды по пп. 1-5 и белки и полипептиды по п. 6, обладающие иммуномодулирующей активностью
11. Химические соединения, не являющиеся природными пептидами или белками, обладающие антипролиферативной, цитотоксической, противоопухолевой или антивирусной активностью, в состав которых входит аминокислотная

Замечено ДПМ 09.03.2004
Синдр

- последовательность, соответствующая пп. 1-5, или их фармацевтически приемлемые соли, или эфиры, или амиды
12. Фармацевтические композиции, включающие пептиды по пп. 1-5, или белки и полипептиды по п. 6, или химические соединения по п. 11, или их фармацевтически приемлемые соли, или эфиры, или амиды
 13. Использование пептидов по пп. 1-5, или белков и полипептидов по п. 6, или химических соединений по п. 11, или их фармацевтически приемлемых солей, или эфиров, или амидов для приготовления фармацевтической композиции, обладающей антипролиферативной, цитотоксической, противоопухолевой или антивирусной активностью
 14. Использование пептидов по пп. 1-5, или белков и полипептидов по п. 6, или химических соединений по п. 11, или их фармацевтически приемлемых солей, или эфиров, или амидов, или фармацевтических композиций по п. 12 для лечения онкологических заболеваний
 15. Использование пептидов по пп. 1-5, или белков и полипептидов по п. 6, или химических соединений по п. 11, или их фармацевтически приемлемых солей, или эфиров, или амидов, или фармацевтических композиций по п. 12 для лечения вирусных инфекций
 16. Нуклеотидный сиквенс, кодирующий любой из пептидов по пп. 1-5
 17. Вектор, подходящий для экспрессии любого из пептидов по пп. 1-5 в клетке-хозяине, которая экспрессирует этот пептид после трансформации, включая фрагмент ДНК, кодирующий пептид по пп. 1-5
 18. Клетка-хозяин, трансформированная вектором по п. 17

замещено ДПМ 09.03.2004
Синдф

Таблица 1. Гомология сиквенса предлагаемого пептида и прионовых белков млекопитающих.

SEQ ID NO 1 Аллостати́н 1	His	Gly	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln		His	Gly		Thr	His	Gly
SEQ ID NO 2 PrP1 Trast f 80-91	His	Gly	Gly		Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly			Gly	Gly
SEQ ID NO 3 PrP1 Trast f 96-108	His	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln		Gly	Gly		Thr	His	Gly
SEQ ID NO 4 PrP2 Trast f 64-75	His	Gly	Gly		Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Val			Gly	Gly
SEQ ID NO 5 PrP2 Trast f 72-83	His	Val	Gly		Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly			Gly	Gly
SEQ ID NO 6 PrP2 Trast f 88-100	His	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln		Gly	Gly		Thr	His	Gly
SEQ ID NO 7 Prio bovin f 96-108	His	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln		Gly	Gly		Thr	His	Gly
SEQ ID NO 8 Prio bovin f 64-75	His	Gly	Gly		Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly			Gly	Gly
SEQ ID NO 9 PrP Human f 52-66	Gln	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly
SEQ ID NO10 PrP Human f 69-83	His	Gly	Gly	Gly		Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly
SEQ ID NO11 PrP Human f 85-97	His	Gly	Gly	Gly		Trp	Gly	Gln		Gly	Gly	Gly	Thr	His	Ser
Консенсус- сиквенс						Trp	Gly	Gln							

Таблица 2. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей аллоферона 1 и аллостатина 1.

Позиции	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
SEQ ID NO 1 Аллостатин 1	His	Gly	Val	Ser	Gly	<u>Trp</u>	Gly	Gln	His	Gly	<u>Thr</u>	His	Gly
SEQ ID NO 2 Аллоферон 1	His	Gly	Val	Ser	Gly	<u>His</u>	Gly	Gln	His	Gly	<u>Val</u>	His	Gly

Таблица 3. Сравнительный анализ общих структурных формул аллоферонов и аллостатинов.

Аллофероны	X ₁	His	Gly	X ₂	His	Gly	Val	X ₃
Аллостатины	X ₁	Trp	Gly	Gln	X ₂			

Таблица 4. Комбинированное действие циклофосфида и аллостатина на способность опухолевых клеток линии Р388Д1 к образованию дочерних клонов

Препарат	Концентрация	Кол-во клонов в отдельных лунках			Среднее кол-во клонов
		1	2	3	
Контроль	-	16	16	12	14,7 ± 1,3
Циклофосфамид	1,5 мкг/мл	12	19	14	15,0 ± 2,1
Аллостатин	0,1 мкг/мл	21	20	14	18,3 ± 2,2
	1 мкг/мл	14	19	19	17,3 ± 1,7
	10 мкг/мл	16	15	21	17,3 ± 1,9
Циклофосфамид + Аллостатин	1550 нг/мл + 0,1 мкг/мл	8	8	9	8,7 ± 0,3
	1550 нг/мл + 1 мкг/мл	6	6	10	7,3 ± 1,3
	1550 нг/мл + 10 мкг/мл	3	4	4	3,7 ± 0,3

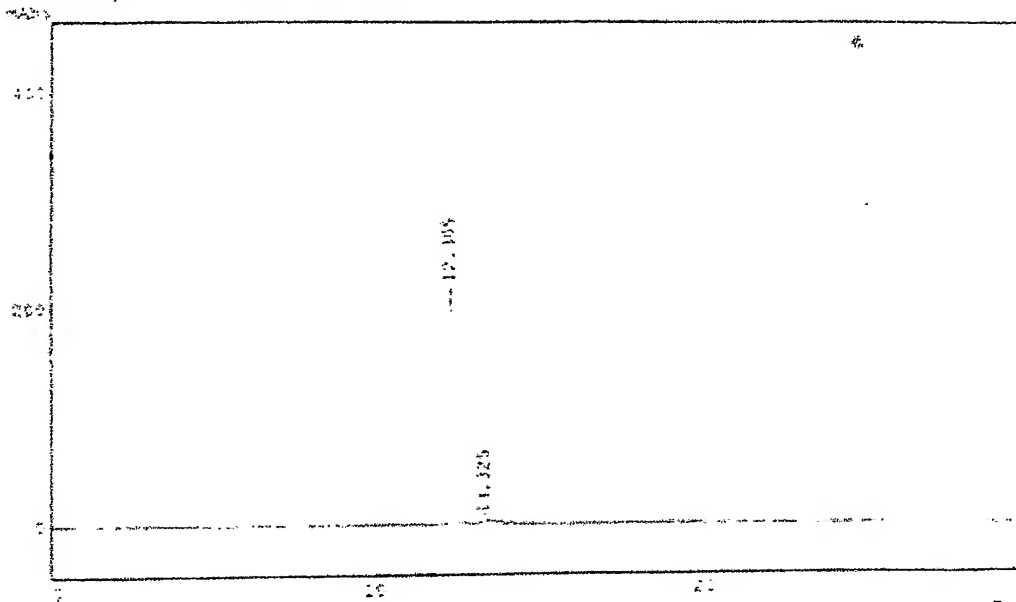
Таблица 5. Противовирусная активность препаратов аллостатин и аллоферон в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) на модели летальной гриппозной инфекции у белых мышей.

Препарат	Доза вируса, LD ₅₀	Смертность животных (пало/заражено, шт.).	Процент гибели, %	Смертность по сумме двух доз вируса, %
Контроль	30	10/10	100	90
	3	8/10	80	
Аллоферон	30	6/10	60	50**
	3	4/10	40	
Аллостатин	30	7/10	70	50**
	3	3/10	30	

** Вероятность отличия от контроля $P < 0,01$

MISS-2010 Ver.v1.64A SYS=1 CH=2 REPORT.NO=1 DATA=W8.D01 02/12/17 15:14:54
 Sample : A1721
 1

*** Chromatogram *** File:W8.D01



Peak	Time	Area	Height	Wt	Conc	Name
1	11.325	117191	223276	97.5461		
2	12.105	54168	7524	2.4539		
		171359	229902	100.0000		

<Temperature>

1 - 1/1

0.12 - 10.17

Рис.1. Финальный этап очистки аллостатина 1 методом ВЭЖХ.

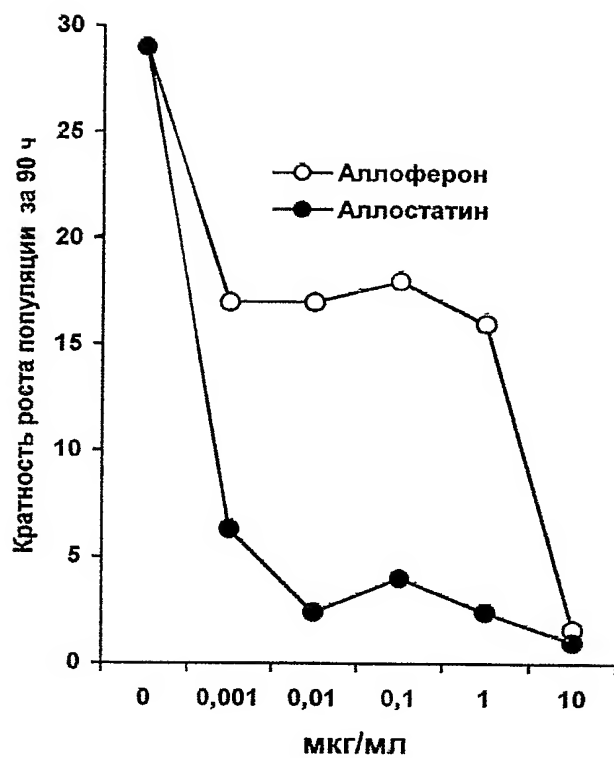


Рис. 3. Влияние аллостати́на и аллоферона на пролиферацию опухолевых клеток линии Р388Д1 *in vitro*

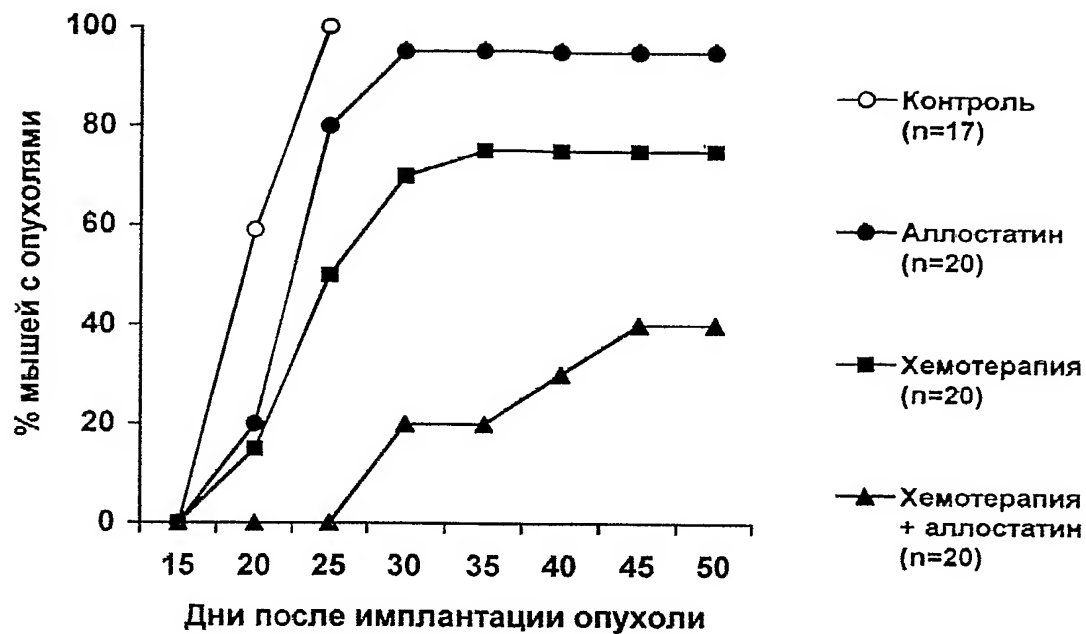


Рис. 4. Подавление роста опухоли у мышей линии DBA, имплантированных клетками сингенной лимфоидной неоплазмы P388, при комбинированном введении цитостатиков (хемотерапия) и аллостати́на

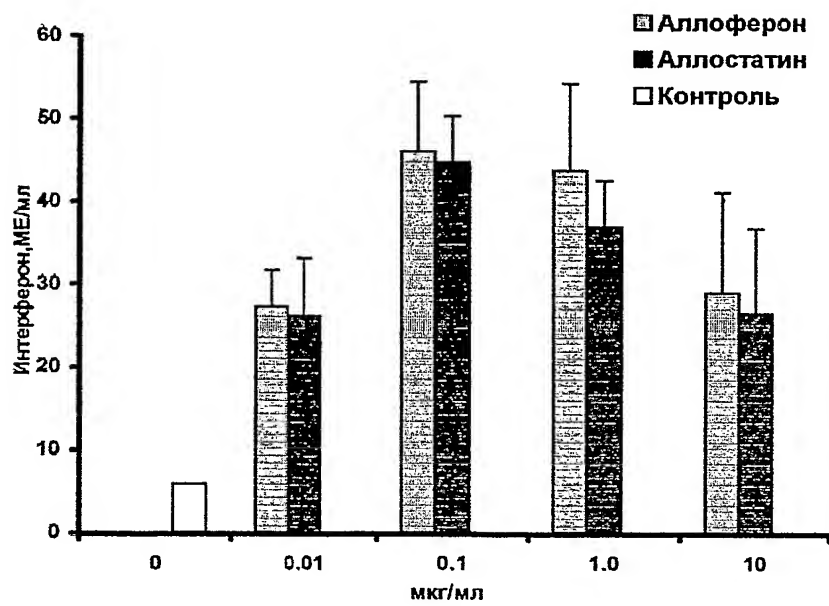


Рисунок 5. Продукция интерферона лейкоцитами человека *in vitro* в присутствии аллоферона и аллостатина.

Реферат

Описываются новые соединения общей формулы I: X_1 Trp Gly Gln X_2 или их фармацевтически приемлемые соли, или эфиры, или амиды, где X_1 отсутствует, либо содержит не менее 1 аминокислоты, X_2 отсутствует, либо содержит не менее 1 аминокислоты. Соединения оказывают противоопухолевое и антивирусное действие путем подавления пролиферации опухолевых клеток, потенцирования действия других противоопухолевых препаратов, стимуляции механизмов противоопухолевого и антивирусного иммунитета. 1 независимый и 17 зависимых пунктов формулы изобретения, 5 илл., 5 таблиц.

Перечень последовательностей

<110> Черныш Сергей Иванович; Chernysh Sergey Ivanovich

<120> Противоопухолевые и антивирусные пептиды

<160> 12

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аллостатин 1

<400> 1

His Gly Val Ser Gly Trp Gly Gln His Gly Thr His Gly
1 5 10

<210> 2

<211> 264

<212> PRT

<213> Tragelaphus strepsiceros

<220>

<223> fragment AA 80-91 of Trast prion protein 1 precursor (PrP1 Trast)

<308> Swissprot P40242

<309> 1995-02-31

<400> 2

His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 3

<211> 264

<212> PRT

<213> Tragelaphus strepsiceros

<220>

<223> fragment AA 96-108 of Trast prion protein 1 precursor (PrP1 Trast)

<308> Swissprot P40242

<309> 1995-02-31

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Gly
1 5 10

<210> 4

<211> 256

<212> PRT

<213> Tragelaphus strepsiceros

<220>

<223> fragment AA 64-75 of Trast prion protein 2 precursor (PrP2 Trast)

<308> Swissprot P40243

<309> 1995-02-31

<400> 4

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Val Gly Gly

<210> 5

<211> 256

<212> PRT

<213> Tragelaphus strepsiceros

<220>

<223> fragment AA 72-83 of Trast prion protein 2 precursor (PrP2 Trast)

<308> Swissprot P40243

<309> 1995-02-31

<400> 5

Val Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly

<210> 6

<211> 256

<212> PRT

<213> Tragelaphus strepsiceros

<220>

<223> fragment AA 88-100 of Trast prion protein 2 precursor (PrP2 Trast)

<308> Swissprot P40243

<309> 1995-02-31

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Gly

<210> 7
<211> 264
<212> PRT
<213> Bos taurus
<220>
<223> fragment AA 96 - 108 of Bovine prion protein 1 precursor (Prio bovin)
<308> Swissprot P10279
<309> 1989-03-10
<400> 7
Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Gly

<210> 8
<211> 264
<212> PRT
<213> Bos taurus
<220>
<223> fragment AA 64-75 of Bovine prion protein 1 precursor (Prio bovin)
<308> Swissprot P10279
<309> 1989-03-10
<400> 8
Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly

<210> 9
<211> 253
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> fragment AA 52-66 of human prion protein precursor (PrP Human)
<308> Swissprot P04156
<309> 1986-11-03
<400> 9
Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly

<210> 10
<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> fragment AA 69-83 of human prion protein precursor (PrP Human)

<308> Swissprot P04156

<309> 1986-11-03

<400> 10

His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly

<210> 11

<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> fragment AA 85-97 of human prion protein precursor (PrP Human)

<308> Swissprot P04156

<309> 1986-11-03

<400> 11

His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Ser

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Calliphora vicina

<220>

<223> Аллоферон 1

<310> RU 2172322 C1

<311> 1999-12-27

<312> 2001-08-20

<400> 12

His Gly Val Ser Gly His Gly Gln His Gly Val His Gly

1

5

10